

よりも高い効率で樹脂を付着することなく効率的に遮断子導入を行うことができる、遮断子導入への遮断子導入効率を向上させることを提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の者は、既存研究の結果、アグロバクテリウム菌細胞を用いた遮断子導入方法において、遮断子導入に対する細胞細胞又は細胞組織を熱処理及び熱処理するにより、遮断子導入効率を向上させることを発見した。

【0008】すなわち、本発明は、細胞細胞又は細胞組織を熱処理及び熱処理することを伴う、アグロバクテリウム菌細胞を介して行われる細胞細胞への遮断子導入の効率を向上させることを発見した。

【0009】

【発明の実施の形態】本実施の方法では、アグロバクテリウム菌細胞を介した遮断子導入方法において、遮断子導入する細胞細胞又は細胞組織を熱処理及び熱処理することを伴う。植物細胞又は植物細胞組織を熱処理及び熱処理することを伴う。植物細胞又は植物細胞組織を熱処理及び熱処理することを伴う。常温及び熱の重圧下でアグロバクテリウム菌細胞と接触させてもよいし、熱処理及び/又は冷凍処理しながらアグロバクテリウム菌細胞と接触させてもよい。また、アグロバクテリウム菌細胞と接触させ前か熱処理及び熱処理を行ふ場合、これらの処理は同時に実行してもよいし、いずれかの処理を行った後にも一方の処理を行ってもよい。

【0010】熱処理条件は、用いる細胞の性質や熱処理する細胞又は組織の性質等に応じて適宜選択されるが、通常、30℃～80℃、特にしかし33℃～55℃、さらには0℃ましくは3～7℃～52℃程度の温度範囲で行われる。また、熱処理の時間は、熱処理温度で用いる細胞種及び熱処理する細胞又は組織の性質等に応じて適宜選択されるが、通常5秒間～2小時間程度である。なお、熱処理時間は、熱処理温度が低い場合には短くても遮断子導入効率を有効向上させることができる。例えば、熱処理温度が60℃の場合には5分熱処理度の熱処理時間でも遮断子導入効率を有効向上させることができる。時間中でも遮断子導入効率を有効向上させることができる場合がある。一方、熱処理温度が34℃程度の低温の場合には、数十時間の熱処理により遮断子導入効率を有効向上させることができると、特に好む熱処理条件は、37℃～52℃で1分間～2.4時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は細胞組織にとっての適切な熱処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。なお、植物細胞又は細胞組織を55℃以上の温度で長時間にわたって熱処理すると、植物細胞がダメージを受ける、形質転換効率が低下する場合があるので、熱処理温度が55℃以上の場合には、熱処理時間は短くし、例えば3分間以下、好ましくは1分間以下程度に設定して、例えば細胞細胞がダメージを受けないようにすることが好ましい。

樹であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

(00116) まず、腫瘍性のプラスミドのT-DNAからホルモニン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の遺伝子 (disarmed strains) であるLB4404 (Ishikawa et al., 1983参考文献(14)), C58G (GOV188) (Zambroski et al., 1983参考文献(44)), G3411 (Fraley et al., 1983参考文献(10))などが作製された (図3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのT-DNA導入系に導入する方法であり、これを有するアグロバクテリウム導入系の選択 (Fraley et al., 1983参考文献(44))、特開昭57-104835 (Nitski et al., 1983参考文献(44))、特開昭57-167378 (Fraley et al., 1983参考文献(10))を用いてベクター (bacteriary vector) とよばれるもので (図3)。T-DNAの植物への組み込みに必要な機能が必要であるが、能能するため同じプラスミド上に存在する必要はないという結果 (Ishikawa et al., 1983参考文献(10))に基づいて、このvir遺伝子はvirB, virC, virD, virE, virF, virGが存在し、(植物バイオテクノロジー雑誌 (1989))、vir機能とはこのvirB, virC, virD, virE, virF, virGがvir遺伝子の全てを含むものである。したがって、バイオベクターは、T-DNAをアグロバクテリウム大腸菌の両端で切断可能なないしはされなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型T-DNA導入系の両端で切断可能なベクターとして用いる。アグロバクテリウムへのバイオベクター導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイオベクターには、PBIN19 (Bevan, 1984参考文献(21)), pGAGB (In et al., 1988参考文献(22)), 特開昭60-70805号 (EP198800000000) などがあり、これらとともに多くの新しいバイオベクターが開発され、形質転換用に用いられている。

(00117) アグロバクテリウムA281 (Watson et al., 1979参考文献(42))は、強制原性 (super-virulent) の関係であり、その宿主範囲は広く、形質転換能も他の菌株よりも高い (Hood et al., 1987参考文献(15); Kami et al., 1988参考文献(23))。この特性は、A281が有するT-DNAミクドのT-DNA導入系によるものである (Hood et al., 1986参考文献(65))。

(00118) 0110542を用いて、これまでに2つの新しいシステムが開発されている。一つはpIB1054のディスアーム型のT-DNA導入系を有する菌株EP101 (Hood et al., 1986参考文献(17))およびEP105 (Hood et al., 1991参考文献(16))を用いたものであり、これらを上述のバイオベクター導入システムに適用することにより、形質転換能の高いシステムとして種々の菌株の形質転換が実現されている。もう一つは、スーパーバイオベクター ('super-binary' vector) (Hiei et al., 1994参考文献(13)); Ishida et al., 1996参考文献(20); Konari et al., 1998参考文献(28); W095/05722号)システムである (図4)。このシステムは、vir遺伝子 (virA, virB, virC, virD, virE, virF, virG) がvir遺伝子 (virA, virB, virC, virD, virE, virF, virG) というくことである。) を持つディスクーム型のT-DNAミクドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイオベクター導入系の構成である。しかしながら、T-DNAを有する菌のプラスミド、即ちバイオベクター導入系は、少なくとも一つのvir遺伝子が付いているが、vir遺伝子はvir遺伝子を含む断片、さらには少なくともvir遺伝子又はvir遺伝子を含む断片を組み込んだ (Kmari, 1990参考文献(29))。このスーパーバイオベクターを用いることで異なる。なお、スーパーバイオベクターを行なうアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだDNA供導を導入するには、三系交雑法を介した組合組換えが容易な手法として利用できる (Konari et al., 1996参考文献(27))。このスーパーバイオベクターは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多くのアグロバクテリウムで、上述の形質転換効率をもたらすことが明らかとなっている (Hiei et al., 1994参考文献(11)); Ishida et al., 1996参考文献(20); Konari, 1990参考文献(25); Li et al., 1996参考文献(29); Saito et al., 1992参考文献(30))。

(00119) 本発明の方法においては、前項となるアグロバクテリウム導入系としては、特に選定されないが、Agrobacterium tumefaciens (例えは上記のAgrobacterium tumefaciens LBA4404 (Hood et al., 1986参考文献(1)) (pIB1054)およびEP101 (Hood et al., 1986参考文献(1)) (vir) 開発の選正子群の発現) を用まなければいけない。

(00120) 本発明の方法によれば、アグロバクテリウム菌細胞における宿主性 (vir) 開発の選正子群の発現に基づく選正子導入系であれば、特に選定されることはなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイオベクター、強制原性のバイオベクター、スーパーバイオベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができる。これらのベクター類による効率的な開発が可能となることができる。これからのベクター類による効率的な開発が可能となることなどが、本発明による特徴である。

7 ても同様である（例えば、アグロバクテリウム頸細胞の一部または全部を切り出した付加的にプラスミド中に組み込み、*in vivo*法の一部としてアグロバクテリウム法による遺伝子導入法を切り出し始めたなど）。また、当然ではあるが本実験の方法によっては、野生型のアグロバクテリウム法によれば、野生型の遺伝子導入が向かうだけではなく、他のアグロバクテリウム法によつては遺伝子導入することができなかつた結果物に対しても本実験の方法により遺伝子導入が初めて可能になつた。従つて、本実験における「遺伝子導入の効率の向上」には、従来の方法では遺伝子導入が不可能であったものを可能にするこ¹⁰とも含められる（すなわち、従来0%であった遺伝子導入効率を向上させたと考へる）。

8 くは別途組み込んだカナマイシン、ハロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子導入等の適当な選択マーカーを基づいて選択することができた。

9 10021 植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT-DNA領域中の選択部位に常法により組み込みにとがができ、当該プラスミドに同時に与し

10 くは別途組み込んだカナマイシン、ハロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子導入等の適当な選択マーカーを基づいて選択することができた。

10028 遺伝子導入の手法では、通常のサブクローニングの手法では所のDNAをT-DNA領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム頸細胞の細胞内での相同組換えを利用することによって目的のDNAを導入することができる。

10022 また、プラスミドを *Agrobacterium tumefaciens*等のアグロバクテリウム頸細胞に導入する操作は従来法により行つうことができ、例としては、上記した三系交雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロリンジクレーション法、RNAなどの代謝的な処理による方法などが含まれる。

10023 植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にはT-DNAの左右端配列間に配置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、導入部に配置しようとする場合には、端部配列が幅以上あつてはならない。また、アグロバクテリウム頸細胞中で、内なるプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミドと共に配置されてもよい。さらには、複数の遺伝子のプラスミド上に配置させることにより行うことができる。例えば、1.0～10.0kb/血/1粒細胞の細胞内濃度のアグロバクテリウム頸細胞を介して遺伝子導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバクテリウム頸細胞と共に配置させることにより行うことができる。

10024 T-DNAの構造は、以下のように行った。

10030 pBS13の構造は、以下のように行った。

10031 pBS13の構造は、以下のように行った。

10032 pBS13の構造は、以下のように示されるよう

10033 pBS13のT-DNA領域には、3.5Sプロモーターにより制御される遺伝子、3.5Sプロモーターにより組み込まれる遺伝子（上述）を有する。

10034 pBS13のT-DNA領域には、3.5Sプロモーターにより制御される遺伝子、3.5Sプロモーターにより組み込まれる遺伝子、3.5Sプロモーターにより制御される遺伝子（上述）を有する。pBS13は形質転換能が高いスバーハイナリーベクター（Komari, T. et al., 1990参考文献(2)8)）である。

10035 (2) 熱処理
供試組群5～200mgを2mlの滅菌水の入ったチューブに設置した。チューブを各処理温度で設定した。チューブに設置後10時間浸漬することにより熱処理を行つた。

10036 (3) 湿熱処理
供試組群を滅菌水の入った滅菌用チューブに設置し、25℃、20,000c/s不分いし60分の湿熱処理を行つた。

10037 (4) 接種および共存培養
熱もしくは湿熱処理、あるいは組合せて処理した後、チューブ内部の滅菌水を濾き、アグロバクテリウムの延菌液を加え、5～30時間がルテックタクシマキサーバーにより振盪した。バクテリア懸濁液の濃度はHiei, Y. et al. (参考文献(13))によつた。すなわち、AB培养地 (Chilton, M.-D. et al., 1974参考文献(7)) 上で3～10日間培養した後、過剰培養液を含む培地上で培養して得られた形質転換細胞の過剰培養液を用い、児-ホ-ヒー-3S-3S示した。

10038 (5) 結果
熱もしくは湿熱処理を組合せた結果は、過剰培養液を含む

10039 (1) 未処理とアグロバクテリウムを共存培養した後、過剰培養液を含む培地上で培養して得られた形質転換細胞の過剰培養液を用い、児-ホ-ヒー-3S-3S示した。未処理と遺伝子導入細胞は明らかに広く、より高頻度で遺伝子導入が生じていた。さらに、熱もしくは湿熱処理を組み合わせることにより、その頻度がさらにも高くなつた。

10040 (2) 結果
Hiei et al. (1994参考文献(13)) 上で3～10日間培養した後、アグロバクテリウムのコロニーを白耳でできとり、修正AA培养地 (AA主要無懸濁液、AAアミン酸及びAAビタミン類 (Toriyama K. et al., 1985参考文献(39))、MS液体培地 (Murashige, T. et al., 1962参考文献(32))、1.0 q/l カザミノ酸、100 μMアセトトリノン・ジン、0.2 M ショ糖、0.2 M クロコース)に懸濁した。また、懸濁液の濃度は、約0.3～1×10⁶cfu/mlに調整した。われが分野では懸濁した後、共存培養用の培地には、8q/l アガロースを含む地圖形質転換細胞としてのZMS-AS (Hiei et al., 1994参考文献(13)) を用いて、25℃、暗黒下で3～7日間共存培養した後、未処理の一部を、Hiei et al. (1994) (参考文献(3)) の方法によりX-Gal処理により遺伝子導入細胞が得られた。すなわち、共存培養處理後、粗離を0.1% Triton X-100 を含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に浸漬し、3.7℃で1時間静置した。リソマリス法でアグロバクテリウムを除去した後、1.0 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロン酸(β-glucuronidase)を含む2% メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。3.7℃で2～4時間処理した後、青色の星色を示す粗離を試験管下で濾過した。

10041 (3) 形質転換細胞の選抜 (ジャボニカイネ)
Hiei et al. (1994参考文献(13)) が行つて遺伝子導入細胞を組合せた後、過剰培養液を用い、上記の組み合わせ処理と同様な効率があることを確認している。

10042 (4) Hiei et al. (1994) (参考文献(13)) は、イネのガラスを材料として比較的高い効率で形質転換細胞を採取することができるところが明瞭化された。

10043 (5) 形質転換細胞の選抜 (ジャボニカイネ)
Hiei et al. (1994) (参考文献(13)) が行つて遺伝子導入細胞を組合せた後、過剰培養液を用い、上記の組み

10044 (6) 結果
Hiei et al. (1994参考文献(13)) は、イネの米熱処理には、4q/lセリウムを組合せた結果には、4q/l Celiteを用いた。また、未処理と遺伝子導入細胞の組合せ

10045 (7) 結果
Hiei et al. (1994参考文献(13)) は、イネの米熱処理には、4q/lセリウムを組合せた後、過剰培養液を用い、上記の組み合わせ処理と同様な効率があることを確認している。

10046 (8) 結果
Hiei et al. (1994参考文献(13)) は、イネの米熱処理には、4q/lセリウムを組合せた後、過剰培養液を用い、上記の組み

【0048】共存培養後の未熟胚をフックスノリシン (NPA) 及び $10 \mu\text{M}$ Magna を含む培地で培養し、形質転換細胞の選択を行った。選択培地上で増殖したカクレヌリティを含む形質転換細胞の再分化を行った。再分化した細胞の一部を取り取り、形質転換法では形質転換できなかった A188以外のカクレヌリティを用いて、QUS遺伝子の表現を調査した。なお、上記の培地および培養法は、Ishii, Y. et al., 1996 (参考文献(20)) に記載の方法に従った。

【0049】各処理を行った未熟胚に LBA4404 (PSB121) を接種したときのQUS遺伝子のトランジェントな表現を表6に示す。無処理の对照組と比較して全ての未熟胚でQUS遺伝子の表現が認められた。

【表6】表6 各処理の遺伝子導入効率に及ぼす影響 (LBA4404 (PSB121)を接種)

処理	実験				結果
	未熟胚	Q	S	U	
無處理	9	0	3	6	0
熱	9	1	7	1	0
達心	12	0	3	9	0
熱+達心	17	5	9	3	0

共存培養後の未熟胚でのQUS遺伝子のトランジェントな表現を表6に示す。無処理の对照組と比較して全ての未熟胚でQUS遺伝子の表現が認められた。しかし、その発現量は対照に比べ熱処理及び熱・達心の組合せ処理した場合ではなく、未熟胚でのQUS遺伝子の表現を示すものが最も多く見られた。

【0050】LBA4404 (PSB121) を接種した未熟胚での形質転換細胞の発現率は13.3%で、無処理に比べ、効率が向上した。熱処理を行った未熟胚での形質転換細胞は20%で、達心処理の約2倍に発現率が向上した。さらに、熱・達心の組合せ処理を行った場合、形質転換細胞は無処理の約3倍の29.6%であった。

【表7】表7 各処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LBA4404 (PSB121)を導入)

処理	供試				無処理	達心	熱	熱+達心	結果
	未熟胚	カクレヌリティ	PPV	NPV					
無處理	23	9 (22.1)	9 (32.1)	3 (10.2)					
熱	30	18 (60.0)	15 (50.0)	8 (25.0)					
達心	30	14 (48.0)	9 (30.0)	4 (13.3)					
熱+達心	27	22 (65.2)	20 (74.1)	8 (22.0)					

カルス数、植物数はいずれもクローンを含まない。

【0051】実施例
クリーピングベントグラス (Agrostis palustris cv. Pencross, 管印種苗 (株) の元供試種子を培地: 15% NS, NS比 1:5, 1 mM/1 dicamba, 0.5 mM/16BA, 0.7 q/1プロリン, 0.5 q/1 MES, 20 q/1 3-氨基-3-ヒドロキシ酸, NS比 1:5) を含む培地 (100倍) に風乾し、25°C、暗黒下で培養した。誘導されたカクレヌリティを含むカクレヌリティ (100倍) に加え、30時間後、T7ZL培地に10 q/1 グルコース、100 μM テトシンゴン、4 q/1 タイプ1アガロース (0.05% 8) を添加した後、T7ZL培地に10 q/1 グルコース、100 μM テトシンゴン、4 q/1 タイプ1アガロース (0.05% 8) を添加した培地 (T7ZL-AS培地) に風乾した。25°C、暗黒下で3日間培養した後、25 mg/1 のセフタキシム及びカルベニシリンを含むT7ZL培地で細胞を回洗浄した。回洗浄後、25°C、70 minで回洗液を替えた。回洗後、同培地に50 mg/1 のハイグロマシンを含む培地で培養し、さらに回洗液を替えた後、一部の細胞を採取しX-qLucにによるQUS遺伝子の発現を調査した。細胞培地を加えた後、5,000 rpm, 4°C、10分間遠心処理 [0055] LBA4404 (PSB121)を接種したシバ細胞培養

細胞でのQUS遺伝子の発現を表8に示す。対照の細胞は、わずかに初期細胞が約5%の発現を示したのみであった。これに対し、熱・達心処理した場合、約5%の細胞がQUS遺伝子の発現を示した。また、QUS遺伝子の発現部位も对照の細胞膜に比べて、熱・達心処理した細胞膜ではその部位は大きかった。

【0056】今までに報告されているシバの形質転換は、(4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sugiyama, K., Fujita, A. (1993) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17: 63-67.
(5) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
(6) Bidney, D., Sculloppe, C., Hartich, J., Burrus, N., Sims, L., and Hoffmann G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Mol. Biol.* 18, 301-313.
(7) Chilton, M.-D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendel, A.J., Gordon, N.P., Master, M. (1974) Agrobacterium tumefaciens DNA and P58 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 3672-3676.
(8) Chu, C. C. (1978) *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press Peking, pp. 43-50.

【表8】表8 シバ細胞質細胞への遺伝子導入効率に及ぼす影響 (参考文献(4))による直接導入法によるシバの形質転換を困難にしている原因であれば、熱・達心で遺伝子導入が困難ではない。アグロバクテリウムによる形質転換の成功例はみられない。本実験でもみられたように、従来法によるシバの形質転換を困難にしている原因であれば、熱・達心で遺伝子導入が困難にできる。アグロバクテリウム法によるシバの形質転換を困難にしている原因であれば、熱・達心で遺伝子導入が困難にできる。アグロバクテリウム法によるシバの形質転換を困難にしている原因であれば、熱・達心で遺伝子導入が困難にできる。

【0057】

【表8】表8 シバ細胞質細胞への遺伝子導入効率に及ぼす熱・達心の効果

処理	細胞効率				結果
	無	熱	達心	熱+達心	
無	79	23	26	1	0
熱	101				1.0

共存培養後の未熟胚でのQUS遺伝子のトランジェントな表現を表7に示す。無処理の对照組と比較して全ての未熟胚でQUS遺伝子の表現が認められた。しかし、その発現量は対照に比べ熱処理及び熱・達心の組合せ処理した場合ではなく、未熟胚でのQUS遺伝子の表現を示すものが最も多く見られた。

【0058】
【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入法よりも高い効率で、粗縫を付与することなく簡便に遺伝子導入を行ふことができる。植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、車子葉植物に対するても双子葉植物に対するものと同様に効率的である。また、シバのように、従来のアグロバクテリウム法では形質転換が困難なかかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能になった。

【0059】
【参考文献】
(1) Aldonita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
(2) An, G., Evert, P.R., Nitra, A., and Ha, S.B. (1998) Binary vectors. In Calvin, S.B. and SchiPper, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A*. 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
(3) Asano, Y., Iwaki, M. (1994) Transgenic plants of *Agristis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.
(4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sugiyama, K., Fujita, A. (1993) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17: 63-67.
(5) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
(6) Bidney, D., Sculloppe, C., Hartich, J., Burrus, N., Sims, L., and Hoffmann G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Mol. Biol.* 18, 301-313.
(7) Chilton, M.-D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendel, A.J., Gordon, N.P., Master, M. (1974) Agrobacterium tumefaciens DNA and P58 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 3672-3676.
(8) Chu, C. C. (1978) *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press Peking, pp. 43-50.
(9) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 347-351.
(10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eisinger, L., Brand, L.A., Fink, C.L., Flick, J.S., Gallopin, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 4803-4807.
(11) Hartman, C.L., Lee, L., Day, P.R., Turner, N. E. (1994) Herbicide resistant turfgrasses (*Agristis palustris* Luds.) by biolistic transformation. *Biotechnology* 12: 919-923.
(12) Iheti, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
(13) Ibeikawa, A., Hirsch, P.R., Itohkaas, P.J.J. and SchiPper, R.A. (1993) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature* 363: 179-180.

【0048】共存培養後の未熟胚をフックスノリシン (NPA) 及び $10 \mu\text{M}$ Magna を含む培地で培養し、形質転換細胞の選択を行った。選択培地上で増殖したカクレヌリティを含む形質転換細胞の再分化を行った。再分化した細胞を取り取り、形質転換法では形質転換できなかった A188以外のカクレヌリティを用いて、シバ細胞を接種した。なお、上記の培地および培養法は、Ishii, Y. et al., 1996 (参考文献(20)) に記載の方法に従った。

【0049】各処理を行った未熟胚に LBA4404 (PSB121) を接種を行ったときのQUS遺伝子のトランジェントな表現を表6に示す。無処理の对照組と比較して全ての未熟胚でQUS遺伝子の表現が認められた。

【表6】表6 各処理の遺伝子導入効率に及ぼす影響 (LBA4404 (PSB121)を接種)

処理	実験				結果
	未熟胚	Q	S	U	
無處理	9	0	3	6	0
熱	9	1	7	1	0
達心	12	0	3	9	0
熱+達心	17	5	9	3	0

共存培養後の未熟胚でのQUS遺伝子のトランジェントな表現を表7に示す。無処理の对照組と比較して全ての未熟胚でQUS遺伝子の表現が認められた。

【表7】表7 各処理の形質転換効率に及ぼす影響 (参考文献(4))

処理	細胞効率				結果
	無	達心	熱	熱+達心	
無	79	23	26	1	0
熱	101				1.0

カルス数、植物数はいずれもクローンを含まない。

【0051】実施例
クリーピングベントグラス (Agristis palustris cv. Pencross, 管印種苗 (株) の元供試種子を培地: 15% NS, NS比 1:5, 1 mM/1 dicamba, 0.5 mM/16BA, 0.7 q/1プロリン, 0.5 q/1 MES, 20 q/1 3-氨基-3-ヒドロキシ酸, NS比 1:5) を含む培地 (100倍) に風乾し、25°C、暗黒下で培養した。誘導されたカクレヌリティを含むカクレヌリティ (100倍) に加え、30時間後、T7ZL培地に10 q/1 グルコース、100 μM テトシンゴン、4 q/1 タイプ1アガロース (0.05% 8) を添付した後、T7ZL培地に10 q/1 グルコース、100 μM テトシンゴン、4 q/1 タイプ1アガロース (0.05% 8) を添付した培地 (T7ZL-AS培地) に風乾した。25°C、暗黒下で3日間培養した後、25 mg/1 のセフタキシム及びカルベニシリンを含むT7ZL培地で細胞を回洗浄した。回洗浄後、25°C、70 minで回洗液を替えた。回洗後、同培地に50 mg/1 のハイグロマシンを含む培地で耕種し、さらに回洗液を替えた後、一部の細胞を採取しX-qLucによるQUS遺伝子の発現を調査した。

【0052】
【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法よりも高い効率で、粗縫を付与することなく簡便に遺伝子導入を行ふことができる。

【0053】
【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法よりも高い効率で、粗縫を付与することなく簡便に遺伝子導入を行ふことができる。

【0054】
【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法よりも高い効率で、粗縫を付与することなく簡便に遺伝子導入を行ふことができる。

【0055】
【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法よりも高い効率で、粗縫を付与することなく簡便に遺伝子導入を行ふことができる。

【0056】
【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法よりも高い効率で、粗縫を付与することなく簡便に遺伝子導入を行ふことができる。

【0057】
【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法よりも高い効率で、粗縫を付与することなく簡便に遺伝子導入を行ふことができる。

【0058】
【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法よりも高い効率で、粗縫を付与することなく簡便に遺伝子導入を行ふことができる。

【0059】
【参考文献】
(1) Aldonita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
(2) An, G., Evert, P.R., Nitra, A., and Ha, S.B. (1998) Binary vectors. In Calvin, S.B. and SchiPper, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A*. 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
(3) Asano, Y., Iwaki, M. (1994) Transgenic plants of *Agristis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.
(4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sugiyama, K., Fujita, A. (1993) Herbicide-resistant transgenic plants of *Oryza sativa* L. obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 12: 243-246.

(11) 19 特開2000-342253

(12) 21 特開2000-342253

(13) 22 *システムを示す模式図である。

(14) 23 [特母の説明]

(15) 24 [特母の説明]

(16) 25 BL [アプロバクテリウム属細胞のT-DNAの左ボーダー

(17) 26 BL [アプロバクテリウム属細胞のT-DNAの右ボーダー

(18) 27 一箇所

(19) 28 BR [アプロバクテリウム属細胞のT-DNAの右ボーダー

(20) 29 一箇所

(21) 30 TC [テラサイクリン抵抗性遺伝子

(22) 31 SP [スペクノマイシン抵抗性遺伝子

(23) 32 IC [イントロンGUS遺伝子

(24) 33 10 IPT [ハイクロマイシン抵抗性遺伝子

(25) 34 NPT [カナマイシン抵抗性遺伝子

(26) 35 COS [コムダムファーザーのCOS部位

(27) 36 ORL [ori oriの複数個存在]

(28) 37 P2SS [CaMV35Sプロモーター

(29) 38 Tnos [ノハリソ合成酵素遺伝子のターミニーター

(30) 39 BAR [bar基因

(31) 40 CDS [CDS部位

(32) 41 ORL [oriの複数個存在]

(33) 42 P35 [P35遺伝子

(34) 43 Tnos [Tnos遺伝子

(35) 44 virB [virB

(36) 45 virC [virC

(37) 46 virD [virD

(38) 47 virE [virE

(39) 48 virF [virF

(40) 49 virG [virG

(41) 50 virH [virH

(42) 51 virI [virI

(43) 52 virJ [virJ

(44) 53 virK [virK

(45) 54 virL [virL

(46) 55 virM [virM

(47) 56 virN [virN

(48) 57 virO [virO

(49) 58 virP [virP

(50) 59 virQ [virQ

(51) 60 virR [virR

(52) 61 virS [virS

(53) 62 virT [virT

(54) 63 virU [virU

(55) 64 virV [virV

(56) 65 virW [virW

(57) 66 virX [virX

(58) 67 virY [virY

(59) 68 virZ [virZ

(60) 69 virA [virA

(61) 70 virB [virB

(62) 71 virC [virC

(63) 72 virD [virD

(64) 73 virE [virE

(65) 74 virF [virF

(66) 75 virG [virG

(67) 76 virH [virH

(68) 77 virI [virI

(69) 78 virJ [virJ

(70) 79 virK [virK

(71) 80 virL [virL

(72) 81 virM [virM

(73) 82 virN [virN

(74) 83 virO [virO

(75) 84 virP [virP

(76) 85 virQ [virQ

(77) 86 virR [virR

(78) 87 virS [virS

(79) 88 virT [virT

(80) 89 virU [virU

(81) 90 virV [virV

(82) 91 virW [virW

(83) 92 virX [virX

(84) 93 virY [virY

(85) 94 virZ [virZ

(86) 95 virA [virA

(87) 96 virB [virB

(88) 97 virC [virC

(89) 98 virD [virD

(90) 99 virE [virE

(91) 100 virF [virF

(92) 101 virG [virG

(93) 102 virH [virH

(94) 103 virI [virI

(95) 104 virJ [virJ

(96) 105 virK [virK

(97) 106 virL [virL

(98) 107 virM [virM

(99) 108 virN [virN

(100) 109 virO [virO

(101) 110 virP [virP

(102) 111 virQ [virQ

(103) 112 virR [virR

(104) 113 virS [virS

(105) 114 virT [virT

(106) 115 virU [virU

(107) 116 virV [virV

(108) 117 virW [virW

(109) 118 virX [virX

(110) 119 virY [virY

(111) 120 virZ [virZ

(112) 121 virA [virA

(113) 122 virB [virB

(114) 123 virC [virC

(115) 124 virD [virD

(116) 125 virE [virE

(117) 126 virF [virF

(118) 127 virG [virG

(119) 128 virH [virH

(120) 129 virI [virI

(121) 130 virJ [virJ

(122) 131 virK [virK

(123) 132 virL [virL

(124) 133 virM [virM

(125) 134 virN [virN

(126) 135 virO [virO

(127) 136 virP [virP

(128) 137 virQ [virQ

(129) 138 virR [virR

(130) 139 virS [virS

(131) 140 virT [virT

(132) 141 virU [virU

(133) 142 virV [virV

(134) 143 virW [virW

(135) 144 virX [virX

(136) 145 virY [virY

(137) 146 virZ [virZ

(138) 147 virA [virA

(139) 148 virB [virB

(140) 149 virC [virC

(141) 150 virD [virD

(142) 151 virE [virE

(143) 152 virF [virF

(144) 153 virG [virG

(145) 154 virH [virH

(146) 155 virI [virI

(147) 156 virJ [virJ

(148) 157 virK [virK

(149) 158 virL [virL

(150) 159 virM [virM

(151) 160 virN [virN

(152) 161 virO [virO

(153) 162 virP [virP

(154) 163 virQ [virQ

(155) 164 virR [virR

(156) 165 virS [virS

(157) 166 virT [virT

(158) 167 virU [virU

(159) 168 virV [virV

(160) 169 virW [virW

(161) 170 virX [virX

(162) 171 virY [virY

(163) 172 virZ [virZ

(164) 173 virA [virA

(165) 174 virB [virB

(166) 175 virC [virC

(167) 176 virD [virD

(168) 177 virE [virE

(169) 178 virF [virF

(170) 179 virG [virG

(171) 180 virH [virH

(172) 181 virI [virI

(173) 182 virJ [virJ

(174) 183 virK [virK

(175) 184 virL [virL

(176) 185 virM [virM

(177) 186 virN [virN

(178) 187 virO [virO

(179) 188 virP [virP

(180) 189 virQ [virQ

(181) 190 virR [virR

(182) 191 virS [virS

(183) 192 virT [virT

(184) 193 virU [virU

(185) 194 virV [virV

(186) 195 virW [virW

(187) 196 virX [virX

(188) 197 virY [virY

(189) 198 virZ [virZ

(190) 199 virA [virA

(191) 200 virB [virB

(192) 201 virC [virC

(193) 202 virD [virD

(194) 203 virE [virE

(195) 204 virF [virF

(196) 205 virG [virG

(197) 206 virH [virH

(198) 207 virI [virI

(199) 208 virJ [virJ

(200) 209 virK [virK

(201) 210 virL [virL

(202) 211 virM [virM

(203) 212 virN [virN

(204) 213 virO [virO

(205) 214 virP [virP

(206) 215 virQ [virQ

(207) 216 virR [virR

(208) 217 virS [virS

(209) 218 virT [virT

(210) 219 virU [virU

(211) 220 virV [virV

(212) 221 virW [virW

(213) 222 virX [virX

(214) 223 virY [virY

(215) 224 virZ [virZ

(216) 225 virA [virA

(217) 226 virB [virB

(218) 227 virC [virC

(219) 228 virD [virD

(220) 229 virE [virE

(221) 230 virF [virF

(222) 231 virG [virG

(223) 232 virH [virH

(224) 233 virI [virI

(225) 234 virJ [virJ

(226) 235 virK [virK

(227) 236 virL [virL

(228) 237 virM [virM

(229) 238 virN [virN

(230) 239 virO [virO

(231) 240 virP [virP

(232) 241 virQ [virQ

(233) 242 virR [virR

(234) 243 virS [virS

(235) 244 virT [virT

(236) 245 virU [virU

(237) 246 virV [virV

(238) 247 virW [virW

(239) 248 virX [virX

(240) 249 virY [virY

(241) 250 virZ [virZ

(242) 251 virA [virA

(243) 252 virB [virB

(244) 253 virC [virC

(245) 254 virD [virD

(246) 255 virE [virE

(247) 256 virF [virF

(248) 257 virG [virG

(249) 258 virH [virH

(250) 259 virI [virI

(251) 260 virJ [virJ

(252) 261 virK [virK

(253) 262 virL [virL

(254) 263 virM [virM

(255) 264 virN [virN

(256) 265 virO [virO

(257) 266 virP [virP

(258) 267 virQ [virQ

(259) 268 virR [virR

(260) 269 virS [virS

(261) 270 virT [virT

(262) 271 virU [virU

(263) 272 virV [virV

(264) 273 virW [virW

(265) 274 virX [virX

(266) 275 virY [virY

(267) 276 virZ [virZ

(268) 277 virA [virA

(269) 278 virB [virB

(270) 279 virC [virC

(271) 280 virD [virD

(272) 281 virE [virE

(273) 282 virF [virF

(274) 283 virG [virG

(275) 284 virH [virH

(276) 285 virI [virI

(277) 286 virJ [virJ

(278) 287 virK [virK

(279) 288 virL [virL

(280) 289 virM [virM

(281) 290 virN [virN

(282) 291 virO [virO

(283) 292 virP [virP

(284) 293 virQ [virQ

(285) 294 virR [virR

(286) 295 virS [virS

(287) 296 virT [virT

(288) 297 virU [virU

(289) 298 virV [virV

(290) 299 virW [virW

(291) 300 virX [virX

(292) 301 virY [virY

(293) 302 virZ [virZ

(294) 303 virA [virA

(295) 304 virB [virB

(296) 305 virC [virC

(297) 306 virD [virD

(298) 307 virE [virE

(299) 308 virF [virF

(300) 309 virG [virG

(301) 310 virH [virH

(302) 311 virI [virI

(303) 312 virJ [virJ

(304) 313 virK [virK

(305) 314 virL [virL

(306) 315 virM [virM

(307) 316 virN [virN

(308) 317 virO [virO

(309) 318 virP [virP

(310) 319 virQ [virQ

(311) 320 virR [virR

(312) 321 virS [virS

(313) 322 virT [virT

(314) 323 virU [virU

(315) 324 virV [virV

(316) 325 virW [virW

(317) 326 virX [virX

(318) 327 virY [virY

(319) 328 virZ [virZ

(320) 329 virA [virA

(321) 330 virB [virB

(322) 331 virC [virC

(323) 332 virD [virD

(324) 333 virE [virE

(325) 334 virF [virF

(326) 335 virG [virG

(327) 336 virH [virH

(328) 337 virI [virI

(329) 338 virJ [virJ

(330) 339 virK [virK

(331) 340 virL [virL

(332) 341 virM [virM

(333) 342 virN [virN

(334) 343 virO [virO

(335) 344 virP [virP

(336) 345 virQ [virQ

(337) 346 virR [virR

(338) 347 virS [virS

(339) 348 virT [virT

(340) 349 virU [virU

(341) 350 virV [virV

(342) 351 virW [virW

(343) 352 virX [virX

(344) 353 virY [virY

(345) 354 virZ [virZ

(346) 355 virA [virA

(347) 356 virB [virB

(348) 357 virC [virC

(349) 358 virD [virD

(350) 359 virE [virE

(351) 360 virF [virF

(352) 361 virG [virG

(353) 362 virH [virH

(354) 363 virI [virI

(355) 364 virJ [virJ

(356) 365 virK [virK

(357) 366 virL [virL

(358) 367 virM [virM

(359) 368 virN [virN

(360) 369 virO [virO

(361) 370 virP [virP

(362) 371 virQ [virQ

(363) 372 virR [virR

(364) 373 virS [virS

(365) 374 virT [virT

(366) 375 virU [virU

(367) 376 virV [virV

(368) 377 virW [virW

(369) 378 virX [virX

(370) 379 virY [virY

(371) 380 virZ [virZ

(372) 381 virA [virA

(373) 382 virB [virB

(374) 383 virC [virC

(375) 384 virD [virD

(376) 385 virE [virE

(377) 386 virF [virF

(378) 387 virG [virG

(379) 388 virH [virH

(380) 389 virI [virI

(381) 390 virJ [virJ

(382) 391 virK [virK

(383) 392 virL [virL

(384) 393 virM [virM

(385) 394 virN [virN

(386) 395 virO [virO

(387) 396 virP [virP

(388) 397 virQ [virQ

(389) 398 virR [virR

(390) 399 virS [virS

(391) 400 virT [virT

(392) 401 virU [virU

(393) 402 virV [virV

(394) 403 virW [virW

(395) 404 virX [virX

(396) 405 virY [virY

(397) 406 virZ [virZ

(398) 407 virA [virA

(399) 408 virB [virB

(400) 409 virC [virC

(401) 410 virD [virD

(402) 411 virE [virE

(403) 412 virF [virF

(404) 413 virG [virG

(405) 414 virH [virH

(406) 415 virI [virI

(407) 416 virJ [virJ

(408) 417 virK [virK

(409) 418 virL [virL

(410) 419 virM [virM

(411) 420 virN [virN

(412) 421 virO [virO

(413) 422 virP [virP

(414) 423 virQ [virQ

(415) 424 virR [virR

(416) 425 virS [virS

(417) 426 virT [virT

(418) 427 virU [virU

(419) 428 virV [virV

(420) 429 virW [virW

(421) 430 virX [virX

(422) 431 virY [virY

(423) 432 virZ [virZ

(424) 433 virA [virA

(425) 434 virB [virB

(426) 435 virC [virC

(427) 436 virD [virD

(428) 437 virE [virE

(429) 438 virF [virF

(430) 439 virG [virG

(431) 440 virH [virH

(432) 441 virI [virI

(433) 442 virJ [virJ

(434) 443 virK [virK

(435) 444 virL [virL

(436) 445 virM [virM

(437) 446 virN [virN

(438) 447 virO [virO

(439) 448 virP [virP

(440) 449 virQ [virQ

(441) 450 virR [virR

(442) 451 virS [virS

(443) 452 virT [virT

(444) 453 virU [virU

(445) 454 virV [virV

(446) 455 virW [virW

(447) 456 virX [virX

(448) 457 virY [virY

(449) 458 virZ [virZ

(450) 459 virA [virA

(451) 460 virB [virB

(452) 461 virC [virC

(453) 462 virD [virD

(454) 463 virE [virE

(455) 464 virF [virF

(456) 465 virG [virG

(457) 466 virH [virH

(458) 467 virI [virI

(459) 468 virJ [virJ

(460) 469 virK [virK

(461) 470 virL [virL

(462) 471 virM [virM

(463) 472 virN [virN

(464) 473 virO [virO

(465) 474 virP [virP

(466) 475 virQ [virQ

(467) 476 virR [virR

(468) 477 virS [virS

(469) 478 virT [virT

(470) 479 virU [virU

(471) 480 virV [virV

(472) 481 virW [virW

(473) 482 virX [virX

(474) 483 virY [virY

(475) 484 virZ [virZ

(476) 485 virA [virA

(477) 486 virB [virB

(478) 487 virC [virC

(479) 488 virD [virD

(480) 489 virE [virE

(481) 490 virF [virF

(482) 491 virG [virG

(483) 492 virH [virH

(484) 493 virI [virI

(485) 494 virJ [virJ

(486) 495 virK [virK

(487) 496 virL [virL

(488) 497 virM [virM

(489) 498 virN [virN

(490) 499 virO [virO

(491) 500 virP [virP

(492) 501 virQ [virQ

(493) 502 virR [virR

(494) 503 virS [virS

(495) 504 virT [virT

(496) 505 virU [virU

(497) 506 virV [virV

(498) 507 virW [virW

(499) 508 virX [virX

(500) 509 virY [virY

(501) 510 virZ [virZ

(502) 511 virA [virA

(503) 512 virB [virB

(504) 513 virC [virC

(505) 514 virD [virD

(506) 515 virE [virE

(507) 516 virF [virF

(508) 517 virG [virG

(509) 518 virH [virH

(510) 519 virI [virI

(511) 520 virJ [virJ

(512) 521 virK [virK

(513) 522 virL [virL

(514) 523 virM [virM

(515) 524 virN [virN

(516) 525 virO [virO

(517) 526 virP [virP

(518) 527 virQ [virQ

(519) 528 virR [virR

(520) 529 virS [virS

(521) 530 virT [virT

(522) 531 virU [virU

(523) 532 virV [virV

(524) 533 virW [virW

(525) 534 virX [virX

(526) 535 virY [virY

(527) 536 virZ [virZ

(528) 537 virA [virA

(529) 538 virB [virB

(530) 539 virC [virC

(531) 540 virD [virD

(532) 541 virE [virE

(533) 542 virF [virF

(534) 543 virG [virG

(535) 544 virH [virH

(536) 545 virI [virI

(537) 546 virJ [virJ

(538) 547 virK [virK

(539) 548 virL [virL

(540) 549 virM [virM

(541) 550 virN [virN

(542) 551 virO [virO

(543) 552 virP [virP

(544) 553 virQ [virQ

(545) 554 virR [virR

(546) 555 virS [virS

(547) 556 virT [virT

(548) 557 virU [virU

(549) 558 virV [virV

(550) 559 virW [virW

(551) 560 virX [virX

(552) 561 virY [virY

(553) 562 virZ [virZ

(554) 563 virA [virA

(555) 564 virB [virB

(556) 565 virC [virC

(557) 566 virD [virD

(558) 567 virE [virE

(559) 568 virF [virF

(560) 569 virG [virG

(561) 570 virH [virH

(562) 571 virI [virI

(563) 572 virJ [virJ

(564) 573 virK [virK

(565) 574 virL [virL

(566) 575 virM [virM

(567) 576 virN [virN

(568) 577 virO [virO

(569) 578 virP [virP

(570) 579 virQ [virQ

(571) 580 virR [virR

(572) 581 virS [virS

(573) 582 virT [virT

(574) 583 virU [virU

(575) 584 virV [virV

(576) 585 virW [virW

(577) 586 virX [virX

(578) 587 virY [virY

(579) 588 virZ [virZ

(580) 589 virA [virA

(581) 590 virB [virB

(582) 591 virC [virC

(583) 592 virD [virD

(584) 593 virE [virE

(585) 594 virF [virF

(586) 595 virG [virG

(587) 596 virH [virH

(588) 597 virI [virI

(589) 598 virJ [virJ

(590) 599 virK [virK

(591) 600 virL [virL

(592) 601 virM [virM

(593) 602 virN [virN

(594) 603 virO [virO

(595) 604 virP [virP

(596) 605 virQ [virQ

(597) 606 virR [virR

(598) 607 virS [virS

(599) 608 virT [virT

(600) 609 virU [virU

(601) 610 virV [virV

(602) 611 virW [virW

(603) 612 virX [virX

(604) 613 virY [virY

(605) 614 virZ [virZ

(606) 615 virA [virA

(607) 616 virB [virB

(608) 617 virC [virC

(609) 618 virD [virD

(610) 619 virE [virE

(611) 620 virF [virF

(612) 621 virG [virG

(613) 622 virH [virH

(614) 623 virI [virI

(615) 624 virJ [virJ

(616) 625 virK [virK

(617) 626 virL [virL

(618) 627 virM [virM

(619) 628 virN [virN

(620) 629 virO [virO

(621) 630 virP [virP

(622) 631 virQ [virQ

(623) 632 virR [virR

(624) 633 virS [virS

(625) 634 virT [virT

(626) 635 virU [virU

(627) 636 virV [virV

(628) 637 virW [virW

(629) 638 virX [virX

(630) 639 virY [virY

(631) 640 virZ [virZ

(632) 641 virA [virA

(633) 642 virB [virB

(634) 643 virC [virC

(635) 644 virD [virD

(636) 645 virE [virE

(637) 646 virF [virF

(638) 647 virG [virG

(639) 648 virH [virH

(640) 649 virI [virI

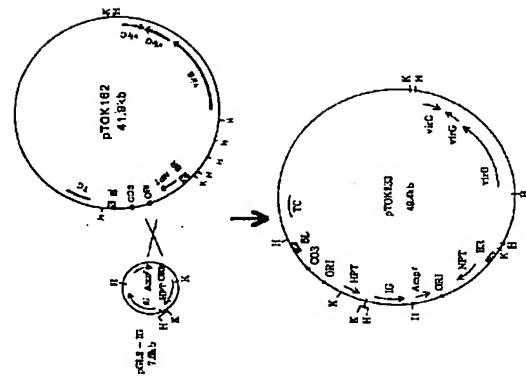
(641) 650 virJ [virJ

(642) 651 virK [

(13)

5502000-342253

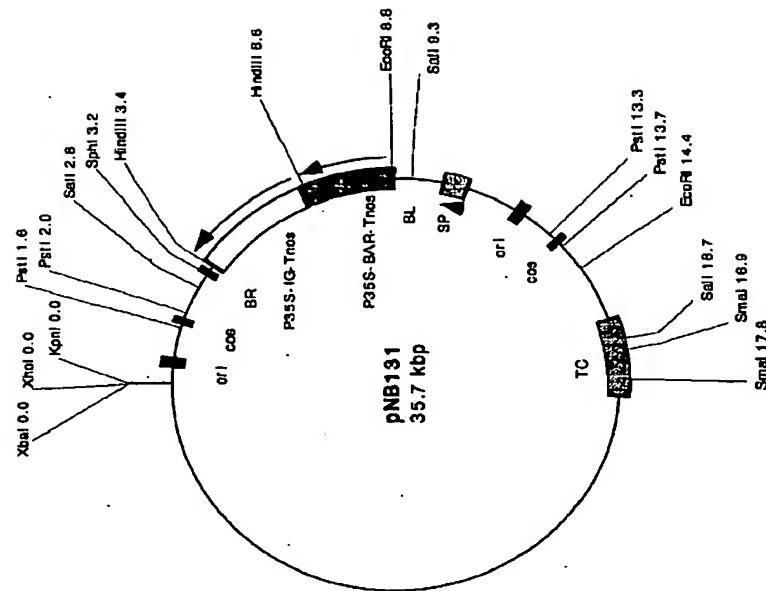
[図1]



(14)

5502000-342253

[図2]



[図3]

